

麦红吸浆虫幼虫不同滞育时期体内山梨醇含量及山梨醇脱氢酶基因表达水平变化

刘 洋¹, 高 贺¹, 李雪娇¹, 仵均祥¹, 成卫宁^{1,*}, 朱克岩²

(1. 西北农林科技大学, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西杨凌 712100;

2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

摘要:【目的】本研究旨在明确麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) 滞育进程中山梨醇含量及山梨醇脱氢酶基因 (*SmSDH*) mRNA 表达水平的变化规律, 探讨麦红吸浆虫滞育与山梨醇含量及 *SmSDH* 表达水平的关系。【方法】分别采用比色法和实时荧光定量 PCR 方法, 对 2013 年 5 月–2014 年 3 月不同时间陕西杨凌养虫圃内麦红吸浆虫滞育前后及滞育期幼虫体内山梨醇含量及 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* mRNA 表达水平进行分析。【结果】麦红吸浆虫幼虫滞育前山梨醇含量最高 (为 9.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$); 滞育期间, 12 月份含量最高 (为 8.50 $\mu\text{g}/\text{mg}$); 滞育解除后山梨醇含量为 3.25 ~ 3.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 显著低于滞育前和整个滞育期 ($P < 0.05$)。山梨醇脱氢酶基因 *SmSDH2a* 及 *SmSDH2b* 在滞育进程中 mRNA 表达水平变化趋势相同, 且与滞育强度递减趋势一致, 即进入滞育后表达水平显著降低 ($P < 0.05$) 并一直稳定在较低水平, 滞育解除后逐渐升高并达到最高。滞育期间, 同期不同滞育状态幼虫之间山梨醇含量和 *SmSDH2a* 表达水平差异不明显, 但裸露幼虫 *SmSDH2b* 表达水平始终高于结茧幼虫。【结论】山梨醇和 *SmSDH* 参与麦红吸浆虫滞育调控, 与滞育维持和解除密切相关。

关键词: 麦红吸浆虫; 滞育; 山梨醇; 山梨醇脱氢酶; 基因表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)02-119-08

Changes in sorbitol content and the expression level of sorbitol dehydrogenase gene in *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages

LIU Yang¹, GAO He¹, LI Xue-Jiao¹, WU Jun-Xiang¹, CHENG Wei-Ning^{1,*}, ZHU-SALZMAN Ke-Yan²

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

Abstract: 【Aim】 This study aims to ascertain the change patterns of sorbitol content and the mRNA expression level of sorbitol dehydrogenase gene (*SmSDH*) in *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) larvae at different diapause stages and to explore the relationship between diapause and sorbitol content and the expression level of *SmSDH* in *S. mosellana*. 【Methods】 Colorimetry and real-time quantitative PCR were respectively used to analyze the sorbitol content and mRNA transcription level of *SmSDH2a* and *SmSDH2b* in pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of *S. mosellana* collected from a field insectary in Yangling, Shaanxi during May 2013 to March 2014. 【Results】 The sorbitol content in pre-diapause larvae

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371933); 陕西省自然基金项目 (2014JM3070); 西北农林科技大学基本科研业务费专项资金项目 (ZD2012003)

作者简介: 刘洋, 女, 1992 年 6 月生, 河南三门峡人, 硕士研究生, 研究方向为害虫综合治理, E-mail: liuyang5820718@sina.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cwning@126.com

收稿日期 Received: 2015-11-10; 接受日期 Accepted: 2015-12-25

of *S. mosellana* was the highest (9.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$). During diapause, the sorbitol content in December was the highest, which was 8.50 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The sorbitol content in post-diapause larvae was 3.25 – 3.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$, significantly lower than those in pre-diapause and diapause larvae ($P < 0.05$). Change trends of the mRNA transcription levels of *SmSDH2a* and *SmSDH2b* in the process of diapause were similar and closely consistent with the decreasing trend of diapause intensity. Namely, the relative expression levels of *SmSDH2a* and *SmSDH2b* reduced significantly after the larvae entered diapause ($P < 0.05$) and maintained at a low level during diapause. The relative expression levels of *SmSDH2a* and *SmSDH2b* gradually increased and reached the highest after diapause termination. No obvious difference was found in sorbitol content and the relative expression level of *SmSDH2a* between no-cocooned and cocooned larvae, but the expression level of *SmSDH2b* in no-cocooned larvae was higher than that in cocooned larvae at the same diapause stage. 【Conclusion】 Sorbitol and *SmSDH* are involved in diapause of *S. mosellana* and play important roles in diapause maintenance and termination.

Key words: *Sitodiplosis mosellana*; diapause; sorbitol; sorbitol dehydrogenase; gene expression

滞育是由遗传控制的、呼吸代谢速率缓慢的一种动态过程,能使昆虫在不利的环境下存活,并使它的生活周期的活动阶段和可利用的食物来源协调一致。由于滞育在昆虫种的延续和种群繁衍中的重要作用,深入了解滞育机理在农业害虫治理中非常必要(Denlinger, 2008)。

山梨醇属于六碳糖醇,是生物体对热、冷等逆境重要的抗性物质之一(Salvucci *et al.*, 1999, 2000; Michaud and Denlinger, 2007)。研究表明,山梨醇参与许多昆虫的滞育过程,其含量变化与滞育的开始、维持和解除存在密切的关系,如:家蚕 *Bombyx mori* (Niimi and Yaginuma, 1992) 和卤虫 *Artemia sinica* (Wang *et al.*, 2013) 卵滞育,大斑芜菁 *Mytilus phalerata* (朱芬等, 2008) 和赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* (韩瑞东等, 2005) 幼虫滞育,欧洲粉蝶 *Pieris brassicae* (Pullin *et al.*, 1991) 蛹滞育和红蜡 *Pyrrhocoris apterus* 成虫滞育(Koštál *et al.*, 2004) 等。山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH; EC1.1.1.14) 是调节山梨醇代谢的关键酶,它催化山梨醇脱氢转化为糖原。研究发现,卤虫 *AsSDH* 基因(Wang *et al.*, 2013)、红蜡 *PaSDH* 基因(Koštál *et al.*, 2008)、蚊 *Wyeomyia smithilli* *WsSDH1* 和 *WsSDH2* 基因(Emerson *et al.*, 2010) 以及家蚕 *BmSDH1*、*BmSDH2a* 和 *BmSDH2b* 基因(Rubio *et al.*, 2011; 朱娟等, 2014) 在滞育期间表达水平存在明显变化,在山梨醇利用和滞育解除中发挥着重要作用。

麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) 是小麦生产上的重要害虫(Miao *et al.*, 2013; 郝亚楠等, 2014)。一般情况下一年发生1代,小麦抽穗期成虫盛发并产卵,幼虫孵化后危害正在灌浆的小麦籽粒,

小麦黄熟后幼虫脱穗落入土中,以结茧或裸露状态进入滞育,经过夏、秋和冬季,直至翌年春季小麦拔节后恢复活动,滞育期长达10个月,属典型的专性滞育昆虫(武予清等, 2011)。研究表明,该虫体内山梨醇脱氢酶由 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 基因编码,这2个基因在由幼虫到成虫的发育变态过程中表达水平差异显著(Gong *et al.*, 2013),但滞育过程中山梨醇含量及其基因表达如何变化尚不清楚。为弄清麦红吸浆虫滞育与山梨醇含量及山梨醇脱氢酶基因之间的关系,本文对麦红吸浆虫滞育前后及滞育期不同阶段幼虫体内山梨醇含量进行了测定,并对 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 基因转录水平进行了分析,为进一步阐明其滞育机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源

2013年5月小麦黄熟期,在陕西省周至县大量采集被麦红吸浆虫严重危害的麦穗,保存部分麦穗老熟幼虫,作滞育前幼虫样本,其余放入西北农林科技大学校内养虫圃内(土壤经提前处理,保证不含吸浆虫),让老熟幼虫自然落土进入滞育。养虫圃注意保湿,满足虫体入土、打破滞育等对土壤湿度的要求。然后从6月开始至翌年2月,每月淘土采集滞育幼虫(以结茧和裸露状态两种形式存在,一般情况下,结茧幼虫比例远大于裸露幼虫),3月开始解除滞育(2014-03-15)及滞育解除后期(2014-03-30)采集活动幼虫,采集后立即用双蒸水清洗干净,滤纸吸干水分,其中同时期的裸露幼虫(虫体纺锤形,外无茧包被)和结茧幼虫(虫体外观圆形,被一

层丝腺分泌物形成的茧)分开,每 20, 50 或 100 头分装于 1.5 mL 离心管中,液氮快速冷冻后置 -80℃ 保存备用。

1.2 山梨醇含量的测定

山梨醇的提取参考 Wolfe 等 (1998) 及 Hendrix 和 Salvucci (1998) 的方法,略加修改。取同一时间采集的麦红吸浆虫幼虫 200 头,称重后移入玻璃匀浆器中,加入 1.2 mL 80% 乙醇充分研磨,匀浆液转入 2.0 mL 离心管,并置于 70 ~ 75℃ 水浴中加热 30 min,8 000 r/min 离心 15 min,吸取上清;沉淀用 600 μL 80% 乙醇在 70 ~ 75℃ 水浴中再抽提一次,2 次上清液合并后用氮气吹干。然后用 600 μL 双蒸水溶解,等量二氯甲烷萃取杂质,吸取水相,再次用氮气吹干,1.2 mL 双蒸水溶解后用于测定。每处理重复 3 次。

以 D-山梨醇 (Sigma-Aldrich 公司产品) 为标准品,参照梁振明 (2007) 的方法进行测定。取 6 支 2 mL 离心管,每管分别加入 0.05 g/mL 硫酸铜溶液和 0.1 g/mL 氢氧化钠溶液各 180 μL,混合均匀后,依次加入 2 mg/mL 山梨醇标准液 0, 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 和 1.2 mL,不足 1.2 mL 者以双蒸水补足,磁力搅拌显色 15 min 后,离心 3 min,上清液在 655 nm 波长下比色法测定吸光值。重复 3 次。以山梨醇浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

参照标准曲线的制作方法,应用双蒸水定容后的 1.2 mL 样品提取液,测定各样品吸光值,查阅标准曲线,计算麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫体内山梨醇含量。

1.3 SmSDH2a 和 SmSDH2b 表达水平分析

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成:分别取各时期麦红吸浆虫幼虫 20 头,按照 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 (TIANGEN, 北京) 说明书提取总 RNA,经电泳和分光光度计检测后,根据 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连) 反转录试剂盒说明书合成单链 cDNA。实验重复 3 次。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测:以合成的 cDNA 为模板,按照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN, Beijing) 试剂盒说明书,在 iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) 上进行 qPCR 扩增。SmSDH2a 和 SmSDH2b (Gong et al., 2013) 和内参基因 GAPDH (GenBank 登录号: KR733066) 特异性引物见表 1。20.0 μL qPCR 反应体系为:2 × SuperReal PreMix Plus 10.0 μL,上游引

物 (10 μmol/L) 0.8 μL,下游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL,cDNA 模板 1.0 μL,RNase-free ddH₂O 7.4 μL。qPCR 扩增程序为:95℃ 预变性 15 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环;95℃ 1 min;最后从 55℃ 开始,以每循环增加 0.5℃ 后停留 10 s,81 次循环记录熔解曲线。

表 1 qPCR 所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for qPCR	
引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
SDH2a-F	CCTGGGAACAAAGGTTTGTGA
SDH2a-R	TTCAATCGGTCGTCCAAAAT
SDH2b-F	TGGACGACAAGCATCAACTC
SDH2b-R	CGGCAATTAGGGGAAGCTGTA
GAPDH-F	CCATCAAAGCAAGCAAGA
GAPDH-R	CAGCACGGAGCACAAGAC

1.4 数据分析

以麦红吸浆虫滞育前幼虫为基准 (calibrator), 采用 2^{-ΔΔC_T} 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算不同时期幼虫 SmSDH2a 和 SmSDH2b 相对表达量。不同滞育时期幼虫山梨醇含量和基因表达量进行单因素方差分析 (P < 0.05), Duncan 氏新复极差法进行多重比较;同时期不同滞育状态幼虫进行独立样本 t 检验 (P < 0.05), 所有分析均在 SPASS 20.0 统计软件上进行。

2 结果

2.1 麦红吸浆虫滞育前后和滞育期山梨醇含量变化

由图 1 可知,麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫山梨醇含量存在显著差异 (P < 0.05)。滞育前的麦穗老熟幼虫含量较高,为 9.41 μg/mg,入土进入滞育后显著降低,1 个月后降为 6.61 μg/mg。滞育期间,入土进入滞育至 10 月含量比较稳定,11 月后逐渐上升,12 月达到最高 (为 8.50 μg/mg), 然后逐渐下降;统计分析结果表明,滞育期间 12 月含量显著高于翌年 2 月滞育解除前夕。滞育解除后山梨醇含量为 3.25 ~ 3.49 μg/mg,显著低于滞育前和整个滞育期。即麦红吸浆虫滞育进程中,体内山梨醇含量变化与其滞育强度及环境温度有关。

2.2 不同滞育状态幼虫山梨醇含量比较

对同时期既能采集到大量结茧幼虫,又获得足量裸露幼虫的 6 月 20 日、9 月 20 日和 1 月 20 日 3 个时期的 2 种滞育状态幼虫山梨醇含量测定结果分

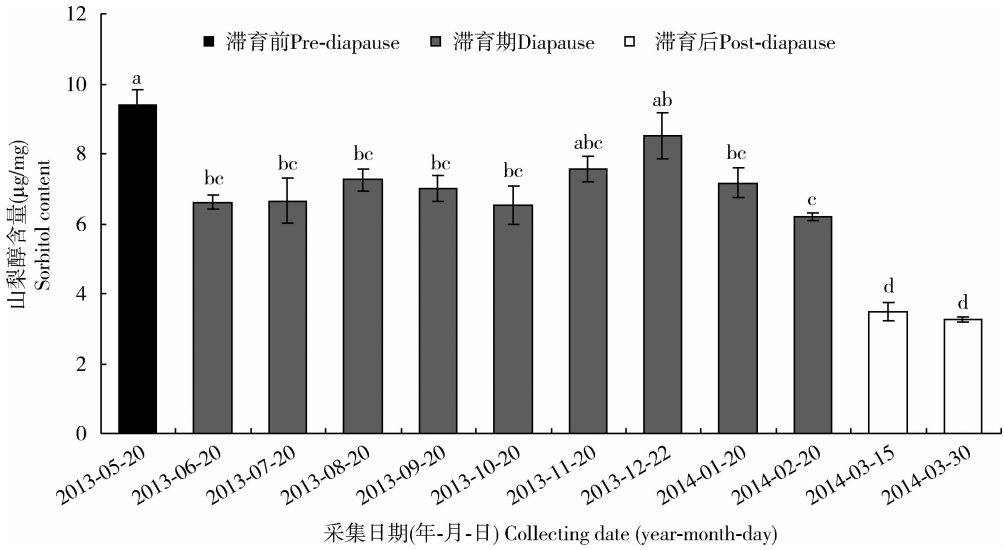


图1 麦红吸浆虫滞育前后及滞育期幼虫山梨醇含量

Fig. 1 Sorbitol content in pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of *Sitodiplosis mosellana*

图中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上不同字母表示经 Duncan 氏多重比较后差异显著 ($P < 0.05$); 图3 同。Data in the figure are mean $\pm$ SE, and different letters above bars show significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The same for the Fig. 3.

析表明, 整个滞育期, 同时期2种滞育状态幼虫山梨醇含量差异均不显著。6月20日结茧幼虫和裸露幼虫山梨醇含量分别为6.61和6.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 9月20日分别为7.00和6.88 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 1月20日分别为7.17和7.31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (图2)。

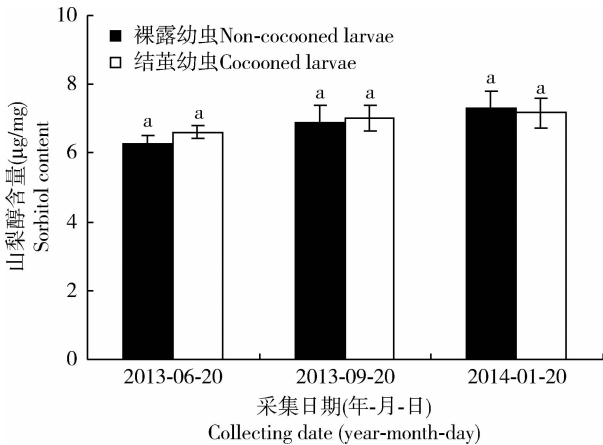


图2 同一滞育阶段麦红吸浆虫结茧幼虫和裸露幼虫山梨醇含量的比较

Fig. 2 Comparison of sorbitol content between cocooned and non-cocooned *Sitodiplosis mosellana* larvae at the same diapause stage

图中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 同时期柱上不同字母表示经 t 检验后差异显著 ($P < 0.05$); 图4 同。Data in the figure are mean $\pm$ SE, and those labeled by different letters within the same period show significant difference by t -test ($P < 0.05$). The same for Fig. 4.

2.3 麦红吸浆虫滞育前后和滞育期 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 表达水平变化

2.3.1 *SmSDH2a*: 由图3(A)可知, 麦红吸浆虫滞

育进程中 *SmSDH2a* 表达量变化非常明显, 滞育前较高(对照), 入土进入滞育后显著降低, 1个月后降为滞育前的0.19倍; 整个滞育期, 虽然各时期有差异, 但一直很低, 仅为滞育前的0.12~0.34倍。滞育解除后表达量显著上升, 其中滞育解除初期已恢复到滞育前的水平, 幼虫活动后期显著高于滞育前。即 *SmSDH2a* 表达量变化趋势与滞育强度递减趋势一致, 可以用作反映麦红吸浆虫幼虫滞育强度的分子指标。

2.3.2 *SmSDH2b*: 与 *SmSDH2a* 一样, 麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫 *SmSDH2b* 表达量差异亦显著, 且滞育进程中的变化趋势一致, 即滞育前(对照)表达量较高, 一旦进入滞育迅速下降; 进入滞育初期至翌年1月表达量基本恒定, 随后逐渐上升, 滞育解除后上升到最高水平即滞育前的1.22~1.82倍。与 *SmSDH2a* 不同的是, *SmSDH2b* 在翌年2月即滞育解除前表达量已恢复到滞育前的水平(图3: B)。

2.4 不同滞育状态幼虫 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 表达水平比较

为明确两种滞育状态幼虫 *SmSDH* 表达水平的差异, 我们对2013年6月、9月和12月同一时期采集的裸露幼虫和结茧幼虫 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 表达水平进行了比较分析。结果显示, 整个滞育期, 同时期裸露幼虫和结茧幼虫 *SmSDH2a* 表达量无显著差异; 但各时期裸露幼虫 *SmSDH2b* 表达量均高于结茧幼虫, 且在12月存在显著差异(图4)。

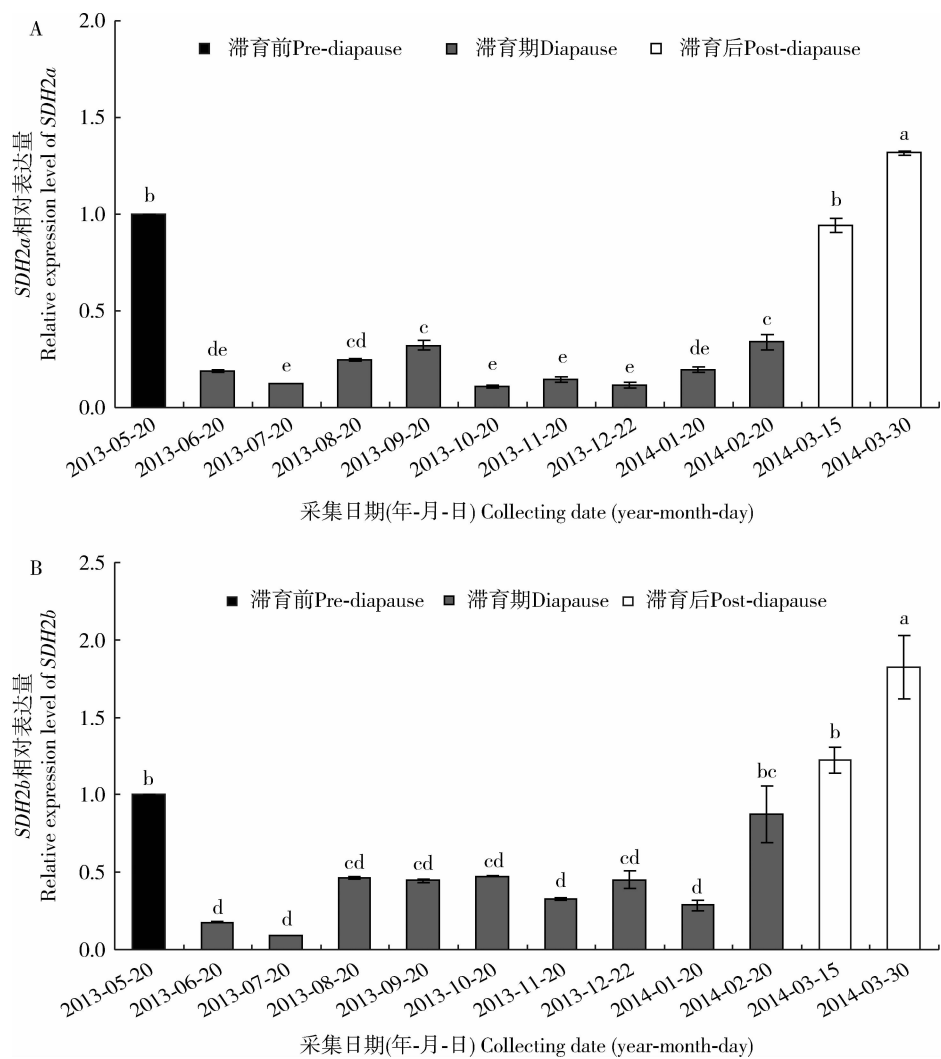


图3 麦红吸浆虫滞育前后及滞育期 *SmSDH2a* (A) 和 *SmSDH2b* (B) 相对表达水平

Fig. 3 Relative expression level of *SmSDH2a* (A) and *SmSDH2b* (B) in pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of *Sitotiplosis mosellana*

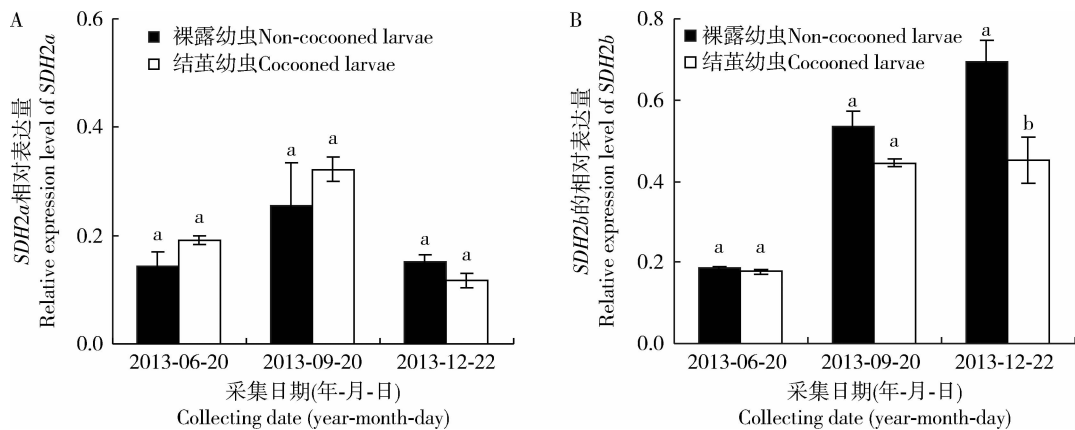


图4 同一滞育阶段麦红吸浆虫结茧幼虫和裸露幼虫 *SmSDH2a* (A) 和 *SmSDH2b* (B) 相对表达水平比较

Fig. 4 Comparison of the relative expression level of *SmSDH2a* (A) and *SmSDH2b* (B) between cocooned and non-cocooned larvae of *Sitotiplosis mosellana* at the same diapause stage

3 讨论

为了顺利地度过不良环境,许多昆虫在滞育期积累低分子量的多元醇和糖。山梨醇是滞育昆虫最常见积累的多元醇之一,不同昆虫积累山梨醇的方式不同。研究表明,家蚕 *B. mori* 进入滞育后,卵巢内储存的糖原迅速转化为山梨醇和甘油并在整个滞育期维持较高水平;滞育终止时,山梨醇和甘油又重新转化为糖原 (Yaginuma and Yamashita, 1978; Niimi and Yaginuma, 1992)。然而与此不同,许多昆虫滞育后直到低温刺激才开始积累山梨醇,如实蝇 *Eurostu solidaginis* (Storey and Storey, 1986)、大姬蛛 *Achaearanea tepidariorum* (Tanaka, 1995) 和菜粉蝶 *P. brassicae* (Pullin *et al.*, 1991)。目前已经发现,山梨醇不仅可以作为防冻剂,在稳定亚细胞结构和功能上起作用,同时也具有阻止昆虫发育的作用 (Horie *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2005)。

本研究表明,麦红吸浆虫滞育前山梨醇含量较高,整个滞育期显著高于滞育解除后,表明该虫滞育期也积累山梨醇,但其大量累积起始于滞育准备期,其可能是由从食物中获得的果糖转变而来。研究发现,小麦籽粒成熟期间,灌浆初期即吸浆虫危害盛期籽粒果糖含量最高 (李友军等, 2006)。入土进入滞育期间,12 月含量最高,说明极端低温可刺激山梨醇的合成,这与低温可促进该虫糖原磷酸化酶活性升高以确保糖原转化为山梨醇的结论一致 (仵均祥等, 2004; 成卫宁等, 2009)。滞育解除后山梨醇含量降低,说明幼虫恢复活动后,需要消耗较多的山梨醇以合成生长发育所需的能源物质。这与仵均祥等 (2004) 报道的麦红吸浆虫滞育解除后糖原含量升高,山梨醇是糖原合成前体的结论相符,也与家蚕 *B. mori* 滞育解除后山梨醇转化为糖原的结论一致 (Yaginuma and Yamashita, 1978; Niimi and Yaginuma, 1992)。

山梨醇脱氢酶 (SDH) 是调控山梨醇代谢的关键酶。本研究显示,麦红吸浆虫进入滞育后 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 表达量变化趋势与山梨醇含量和滞育强度递减趋势完全一致,即滞育期间表达量很低,滞育解除前逐渐升高并在幼虫恢复发育后达到最高,说明麦红吸浆虫同家蚕 *B. mori* (Rubio *et al.*, 2011) 和卤虫 *A. sinica* (Wang *et al.*, 2013) 等一样,滞育进程中存在糖原与山梨醇之间的相互转化, *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 在滞育解除中可能起作用。

但蚊虫 *W. smithill* 幼虫滞育期间 *WsSDH* 高表达,滞育终止后表达下降 (Emerson *et al.*, 2010); 红蜡 *P. apterus* 滞育成虫接受到低温刺激后, *SDH* 表达逐渐下降,恢复发育后表达量极低 (Košťál *et al.*, 2008)。有研究表明,一些昆虫无氧代谢终止后产生山梨醇 (Hoback and Stanley, 2001), 据此推测这些昆虫滞育解除后 *SDH* 表达水平的下降可能与其从无氧代谢的恢复有关。

同时期裸露幼虫与结茧幼虫相比,山梨醇含量和 *SmSDH2a* 表达量差异不明显,但各时期裸露幼虫 *SmSDH2b* 表达量均较高,特别是冬季二者有显著差异,说明裸露幼虫滞育程度较浅、代谢能力较强 (张克斌和胡木林, 1988; 成卫宁等, 2008, 2009), 在不利的环境条件下,容易受到伤害。这很好地解释了同时期两种滞育状态并存,但结茧幼虫比例远高于裸露幼虫的事实。

综上所述,山梨醇和 *SmSDH* 参与了麦红吸浆虫的滞育调控,滞育期间山梨醇含量的累积与滞育维持紧密相关,冬季含量的升高可能与其抗寒性有关,滞育解除后 *SmSDH2a* 和 *SmSDH2b* 表达量的升高,为山梨醇的有效利用及恢复发育所需能源物质合成提供了保障。即山梨醇和 *SmSDH* 不仅对麦红吸浆虫的滞育维持十分关键,而且在滞育后的发育中也具有重要作用。

参考文献 (References)

- Cheng WN, Li XL, Li YP, Li JJ, Wu JX, 2009. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages. *Acta Entomol. Sin.*, 52(2): 133–139. [成卫宁, 李修炼, 李怡萍, 李建军, 仵均祥, 2009. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析. 昆虫学报, 52(2): 133–139]
- Cheng WN, Wang HL, Li YP, Li JJ, Li XL, Wu JX, 2008. Change patterns of protective enzyme activities in pre-diapause, diapause, and post-diapause larvae of *Sitodiplosis mosellana* (Géhin). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 19(8): 1764–1768. [成卫宁, 王洪亮, 李怡萍, 李建军, 李修炼, 仵均祥, 2008. 麦红吸浆虫滞育发生和解除过程中保护酶活力动态. 应用生态学报, 19(8): 1764–1768]
- Denlinger DL, 2008. Why study diapause? *Entomol. Res.*, 38: 1–9.
- Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM, 2010. Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of mosquito, *Wyeomyia smithill*. *PLoS ONE*, 5(3): e9574.
- Gong ZJ, Wu YQ, Miao J, Duan Y, Jiang YL, Li T, 2013. Global transcriptome analysis of orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae) to identify candidate

- transcripts regulating diapause. *PLoS ONE*, 8(8): e71564.
- Han RD, Sun XG, Xu YY, Zhang WG, 2005. The biochemical mechanism of cold-hardiness in overwintering larva of *Dendrolimus spectabilis* Butler (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Acta Ecol. Sin.* 25(6): 1352 – 1356. [韩瑞东, 孙绪良, 许永玉, 张卫光, 2005. 赤松毛虫越冬幼虫生化物质变化与抗寒性的关系. 生态学报, 25(6): 1352 – 1356]
- Hao YN, Zhang J, Long ZR, Wang Y, Cheng WN, 2014. Screening of resistance indicators and evaluation of the resistance of wheat varieties to the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(11): 1321 – 1327. [郝亚楠, 张箭, 龙治任, 王越, 成卫宁, 2014. 小麦品种(系)对麦红吸浆虫抗性指标筛选与抗性评价. 昆虫学报, 57(11): 1321 – 1327]
- Hendrix DL, Salvucci ME, 1998. Polyol metabolism in homopterans at high temperatures; accumulation of mannitol in aphids (Aphididae; Homoptera) and sorbitol in whiteflies (Aleyrodidae; Homoptera). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 120: 487 – 494.
- Hoback WW, Stanley DW, 2001. Insects in hypoxia. *J. Insect Physiol.*, 47: 533 – 542.
- Horie Y, Kanda T, Mochida Y, 2000. Sorbitol as an arrester of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 46(6): 1009 – 1016.
- Iwata KI, Fujiwara Y, Takeda M, 2005. Effects of temperature, sorbitol, alanine and diapause hormone on the embryonic development in *Bombyx mori*; *in vitro* tests of old hypotheses. *Physiol. Entomol.*, 30(4): 317 – 323.
- Košťál V, Tamura M, Tollarová M, Zahradníčková H, 2004. Enzymatic capacity for accumulation of polyol cryoprotectants changes during diapause development in the adult red firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Physiol. Entomol.*, 29: 344 – 355.
- Košťál V, Tollarová M, Doležal D, 2008. Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.*, 54(1): 77 – 88.
- Li YJ, Xiong Y, Luo BS, 2006. Comparison among three wheat varieties with different gluten types in carbohydrate metabolism and the enzymes activities in the kernel during grain filling. *J. Northwest Sci-Tech Univ. Agric. For. (Nat. Sci. Ed.)*, 34(1): 13 – 18. [李友军, 熊瑛, 骆炳山, 2006. 不同类型小麦籽粒灌浆期碳水化合物代谢及相关酶活性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 34(1): 13 – 18]
- Liang ZM, 2007. Determination of sorbitol content by spectrophotometry. *China Food Addit.*, (1): 184 – 185, 183. [梁振明, 2007. 分光光度法测定山梨醇含量. 中国食品添加剂, (1): 184 – 185, 183]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.
- Miao J, Wu YQ, Gong ZJ, He YZ, Duan Y, Jiang YL, 2013. Long-distance wind-borne dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera: Cecidomyiidae) in northern China. *J. Insect Behav.*, 26(1): 120 – 129.
- Michaud MR, Denlinger DL, 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J. Comp. Physiol. B*, 177(7): 753 – 763.
- Niimi T, Yaginuma T, 1992. Biosynthesis of NAD-sorbitol dehydrogenase is induced by acclimation at 5°C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 102(1): 169 – 173.
- Pullin AS, Bale JS, Fontaine XLR, 1991. Physiological aspects of diapause and cold tolerance during overwintering in *Pieris brassicae*. *Physiol. Entomol.*, 16: 447 – 456.
- Rubio RO, Suzuki A, Mitsumasu K, Homma T, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2011. Cloning of cDNAs encoding sorbitol dehydrogenase-2a and b, enzymatic characterization, and up-regulated expression of the genes in *Bombyx mori* diapause eggs exposed to 5°C. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(6): 378 – 387.
- Salvucci ME, Hendrix DL, Wolfe GR, 1999. Effect of high temperature on the metabolic processes affecting sorbitol synthesis in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Insect Physiol.*, 45: 21 – 27.
- Salvucci ME, Stecher DS, Henneberry TJ, 2000. Heat shock proteins in whiteflies, an insect that accumulates sorbitol in response to heat stress. *J. Therm. Biol.*, 25(5): 363 – 371.
- Storey JM, Storey KB, 1986. Winter survival of the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*; profiles of fuel reserves and cryoprotectants in a natural population. *J. Insect Physiol.*, 32(6): 549 – 556.
- Tanaka K, 1995. Seasonal change in glycogen and inositol/sorbitol contents of the house spider, *Achaearanea tepidariorum* (Araneae: Theridiidae). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 110(3): 539 – 545.
- Wang T, Hou M, Zhao N, Chen YF, Lv Y, Li ZR, Zhang R, Xin WT, Zou XY, Hou L, 2013. Cloning and expression of the sorbitol dehydrogenase gene during embryonic development and temperature stress in *Artemia sinica*. *Gene*, 521(2): 296 – 302.
- Wolfe GR, Hendrix DL, Salvucci ME, 1998. A thermoprotective role for sorbitol in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Insect Physiol.*, 44: 597 – 603.
- Wu JX, Yuan F, Su L, 2004. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) during mature and diapause stage. *Acta Entomol. Sin.*, 47(2): 178 – 183. [作均祥, 袁锋, 苏丽, 2004. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报, 47(2): 178 – 183]
- Wu YQ, Miao J, Duan Y, Jiang YL, Gong ZJ, 2011. Research and Control of Orange Wheat Blossom Midge. Science Press, Beijing. 1 – 10. [武予清, 苗进, 段云, 蒋月丽, 巩中军, 2011. 麦红吸浆虫的研究与防治. 北京: 科学出版社. 1 – 10]
- Yaginuma T, Yamashita O, 1978. Polyol metabolism related to diapause in *Bombyx* eggs; different behaviour of sorbitol from glycerol during diapause and post-diapause. *J. Insect Physiol.*, 24: 347 – 354.
- Zhang KB, Hu ML, 1988. Seasonal variation of respiratory metabolism of

diapause larvae of orange wheat blossom midge. *J. Northwest Agric. Univ.*, 16(Suppl.): 30–34. [张克斌, 胡木林, 1988. 麦红吸浆虫滞育幼虫呼吸代谢的季节变化. 西北农业大学学报, 16(增刊): 30–34]

Zhu F, Li H, Wang Y, Wang XP, Zhou XM, Huang W, Lei CL, 2008. Change of trehalose, glycogen and polyol contents of the diapausing larvae of *Mylabris phalerata* (Pallas) (Coleoptera: Meloidae) at different diapausing stages. *Acta Entomol. Sin.*, 51(1): 9–13. [朱芬, 李红, 王永, 王小平, 周兴苗, 黄文, 雷朝亮, 2008. 大斑芜菁滞育幼虫在滞育不同阶段体内糖类和醇类含量的变化. 昆虫学报, 51(1): 9–13]

Zhu J, Wang X, Wei BY, Tang SM, Huang JS, Hao BF, Shen XJ, 2014. Characterization of gene transcription level of sorbitol dehydrogenase in the silkworm, *Bombyx mori*. *China Sericulture*, 35(2): 4–7, 12. [朱娟, 王欣, 韦博尤, 唐顺明, 黄金山, 郝碧芳, 沈兴家, 2014. 家蚕山梨醇脱氢酶基因的转录水平特性分析. 中国蚕业, 35(2): 4–7, 12]

(责任编辑: 赵利辉)